

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**STAT jelátviteli útvonalak vizsgálata humán tumor
eredetű sejtvonalakon egyedi sejt szintű módszerekkel**

Csomós István

Témavezető: Dr. Dóczy-Bodnár Andrea



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2022

STAT jelátviteli útvonalak vizsgálata humán tumor eredetű sejtvonalakon egyedi sejt szintű módszerekkel

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Csomós István, okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskolája
(Biofizikai kérdések és vizsgálómódszerek programja) keretében

Témavezető: Dr. Dóczy-Bodnár Andrea, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, MTA doktora

tagok: Dr. Matta Csaba, PhD

Dr. Barna Gábor, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Élettani Intézet könyvtára
2023. március 16. 11:00

Az értekezés bírálói:

Dr. Mádi András, PhD

Dr. Minorics Renáta, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, MTA doktora

tagok: Dr. Barna Gábor, PhD

Dr. Mádi András, PhD

Dr. Matta Csaba, PhD

Dr. Minorics Renáta, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Élettudományi Központ
F.003-004 előadóterem
2023. március 16. 13:00 óra

BEVEZETÉS

A STAT fehérjék

A citoplazmatikus transzkripció faktorok családjába tartozó STAT fehérjék sejtfelszíni receptorok ligandum kötése által kiváltott jeleket továbbítanak a sejtmagba. Emlősökben eddig hét, különböző gének által kódolt STAT fehérjét írtak le, ezek a STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b és STAT6. A STAT fehérjék által aktivált gének kritikus szerepet töltenek be a sejtek proliferációjának, túlélésének és differenciálódásának, valamint funkcionális aktivitásának szabályozásában, melynek révén közreműködésük számos fiziológias folyamatban alapvető jelentőségű. A STAT aktiváció fiziológias körülmények között transziens és szigorúan szabályozott, mely mechanizmusok egyensúlyának felborulása kóros folyamatokhoz, így malignus elváltozások kialakulásához vezethet.

A STAT3 transzkripció faktor felépítése

A STAT3, a többi STAT fehérjéhez hasonlóan hat jól elkülöníthető és meghatározható funkcióval rendelkező erősen konzervált doménből épül fel, melyek az N-terminális végtől kezdve a következők: (1) N-terminális domén (NTD), (2) Coiled-coil domén, (3) DNS-kötő domén (DKD), (4) Linker régió (LR), (5) Src homológia domén (SH2), (6) Transzaktivációs domén (TAD). A transzaktivációs domén tartalmazza a STAT3 két foszforilációs helyét a 705-ös pozícióban elhelyezkedő tirozin és a 727-es pozícióban elhelyezkedő szerin oldalláncon.

Az IL-6/IL-6R/STAT3 jelátviteli út vonal

A STAT3 transzkripció faktor szerepét elsőként az IL-6 jelátvitelében azonosították. Később kimutatták, hogy aktiválódását más citokinek, valamint egyes növekedési faktorok és hormonok is kiválthatják

A citokinek kis molekula tömegű glikoproteinek, melyek kritikus szerepet játszanak a sejtek túlélésében, osztódásában és differenciálódásában. Hatásmechanizmusukra a pleiotropizmus és a redundancia egyaránt jellemző. A célsejtekre gyakorolt hatásukat auto-, para, vagy endokrin jelátvitelen keresztül fejtik ki. Az IL-6 citokint több sejtféleség is termeli, ideértve a monocitákat, makrofágokat, fibrocitákat, aktivált T- és B-sejteket, valamint egyes tumorsejteket is. A fokozott IL-6 termelés és az IL-6 jelátviteli út vonal rendellenessége hozzájárul a gyulladással összefüggő betegségek kialakulásához. Központi szerepe van a

krónikus gyulladás és a daganatos megbetegedések összekapcsolásában azáltal, hogy elősegíti a tumormikrokörnyezet fenntartását, a tumornövekedést, az angiogenezist, a metasztázis kialakulását, valamint gátolja a tumorsejtek apoptózist, ezzel biztosítva azok túlélését.

Az IL-6R komplex egy 80kDa nagyságú IL-6R α (másnéven gp80 vagy CD126) alegységből és a közös jelátviteli alegységből a gp130-ból (glikoprotein 130) épül fel. Míg a gp130 minden sejten kifejeződik, addig az IL-6R α expressziója fiziológiai körülmények között néhány sejt típusra korlátozódik, így hepatocitákra, epitel sejtekre, illetve egyes leukocitákra.

Az IL-6 által kiváltott STAT3 aktiváció első lépéseként a citokin hozzákötődik a célsejt membránján elhelyezkedő IL-6R α alegységhez, ami a gp130-hoz történő kapcsolódást eredményezi. Két IL-6R α /IL-6/gp130 heterotrimer összekapcsolódásával alakul ki a funkcionálisan aktív hetero hexamer szerkezet, ami aktiválja a citoplazmatikus oldallánchoz konstitutívan kapcsolt Janus kinázokat (JAK). A JAK-ok auto- és transz-foszforilációval foszforilálják egymás tirozin oldalláncát, valamint a gp130 citoplazmatikus oldalán elhelyezkedő négy tirozin oldalláncot is, melyek így molekuláris dokkolóként szolgálnak a monomimerikus, nem foszforilált STAT3 fehérjéknek. A STAT3 fehérjék toborzása után a JAK-ok a STAT3-at is foszforilálják a tirozin oldalláncon, ami a STAT3-STAT3 homodimerek kialakítását eredményezi a foszfortirozin-SH2 doménen keresztül. A dimerek a sejtmagba transzlokálódnak, ahol kötődnek a specifikus STAT DNS-válasz elemekhez és közvetlenül szabályozzák célgénjeik expresszióját.

A STAT3 transzkripciós faktor a tirozin oldallánc mellett tartalmaz egy második foszforilációs helyet is a 727-es pozícióban elhelyezkedő szerin oldalláncon. A STAT3 szerin foszforilációjában több szerin/treonin kináz is részt vesz, ideértve a CDK 1 és 5, valamint a MAP kinázokat. A rendelkezésre álló adatok alapján a szerin foszforiláció pozitív és negatív szabályozó szerepet egyaránt elláthat a kanonikus STAT3 jelátviteli útvonalban, ugyanakkor a hatásmechanizmus még nem minden részletében tisztázott és az adatok sokszor ellentmondanak egymásnak. A szerin oldallánc foszforilációja szükséges a maximális transzkripciós aktivitás eléréséhez, ugyanakkor elősegíti a pTyr-STAT3 defoszforilációját, ezáltal lerövidíti a STAT3 transzkripciós aktivitás időtartamát.

A STAT3 szerin foszforilációja kritikus szerepet játszik a sejtciklus M-fázisának kezdeti szakaszában. A Cdk1/ciklin B1 komplex által közvetített STAT3 szerin foszforiláció a mitózis kezdetekor elnyomja a p21 és p27 Cdk1 inhibitorok expresszióját, ami biztosítja a Cdk1/ciklin B1 komplex aktív állapotának fenntartását. Amint a sejtek kilépnek az M-fázisból a ciklin B ubiquitinációja és következményes degradációja eredményeként a Cdk1 aktivitása csökken, így a szerin foszforiláció helyett a pSer-STAT3 defoszforilációja válik dominánssá.

A p21 és p27 expressziója fokozódik, ami tovább gátolja a Cdk1 aktivitását negatív visszacsatolás révén.

STAT3 szerepe az onkogenezisben

A legtöbb citokin indukált folyamatra jellemzően normál körülmények között a STAT3 aktiváció is egy rendkívül gyors és tranziens folyamat. A patológiás elváltozások megelőzéséhez elengedhetetlen az aktiváció időtartamának és erősségének szoros kontrollja, amelyet negatív regulátorok összetett hálózata tesz lehetővé. A STAT3 aktiváció negatív szabályozói közé tartoznak a PIAS, a SOCS és a PTP fehérjecsaldok tagjai. A PIAS fehérjék gátolják a STAT3 transzkripciós aktivitását azáltal, hogy blokkolják a STAT3 DNS-kötő aktivitását és elősegítik a transzkripciós ko-represszorok toborzását. A SOCS fehérjék kötődésükkel leárnycolják az IL-6/gp130 receptorkomplex STAT3 kötő doménjét, így gátolják a STAT3 fehérjék toborzását. Végül az SHP2 foszfatazok képesek defoszfórilálni a STAT3 fehérjéket a tirozin oldalláncon.

A STAT3 tartósan fennálló tirozin foszfórilációját és következményes aktivációját kimutatták a szolid és hematológiai tumor jelentős részében, ideértve a leukémiát, az emlő, a prosztata és a hasnyálmirigy daganatos megbetegedéseit, valamint a különböző melanómákat is. Az uveális melanóma a leggyakoribb primer intraokuláris rosszindulatú daganat felnőttekben, mely egy rendkívül különleges kórkép, ugyanis a tumorok olyan környezetben alakulnak ki, ahol alapvetően mind a veleszületett, mind az adaptív immunválasz szuprimált. A melanómát tartalmazó szemben több kemokin és gyulladásos citokin, köztük az IL-6 koncentrációja is magasabb, ami fenntartja a konstitutív tirozin foszfórilációt, mely előidézi a tumor transzformációt.

A konstitutív STAT3 aktiváció elősegíti a daganatos sejtek proliferációját, túlélését és elősegíti angiogenezist. A STAT3 közvetlenül szabályozza a VEGF- α és a HIF1 α gének expresszióját, melyek hozzájárulnak a daganatokban az új mikrovászculáris struktúrák kialakulásához. Részt vesz a tumorsejtek migrációjában és inváziójában azáltal, hogy fokozza a mátrix metalloproteáz fehérjék kifejeződését. A fokozott STAT3 aktiváció a daganatokban gátolja a bizonyos gyulladásos citokinek és kemokinek, például TNF- α (tumor nekrosis faktor α) és az INF- γ (interferon- γ) expresszióját, melyek aktiválhatnák a tumorelleses immunitást. A STAT3 gátolja az apoptózis intrinsic útvonalát azáltal, hogy fokozza az antiapoptotikus Bcl-2 fehérjecsald tagjainak az expresszióját, ideértve a Bcl-XL, Mcl-1 és Bcl-w fehérjéket.

Kelidonin

Az alkaloidok növényekben található olyan természetesen előforduló, bázikus, főként heterociklikus szerves vegyületek, melyek legalább egy nitrogénatomot tartalmaznak. A kelidonin az benzofenantridin-vázás alkaloidok csoportjába tartozik, melynek a tagjai két aromás és két alkán gyűrűből épülnek fel. Korábban kimutatták, hogy gátolja a sejtek növekedését és proliferációját, valamint nekrozist és apoptózist indukál számos humán daganatos sejtvonalon, ideértve az uveális melanóma sejtvonalakat is. Képes beindítani a programozott sejthalál intrinszc útvezonát azáltal, hogy fokozza a reaktív oxigén gyökök felszabadulását és csökkenti a mitokondriális membránpotenciált.

A kelidonin gátolja a tubulin szálak polimerizációját és csökkenti a mikrotubulusok mennyiségét a sejtekben. Feltehetően a kolhicin-kötő helyre épül be, mely kötődéssel zavart szenved a mikrotubuláris rendszer dinamikus instabilitása, aminek következtében a sejtciklus leáll a G₂/M fázisban. A G₂/M blokk többek között, olyan morfológiai változásokat eredményez, mint a multipoláris magorsó fonalak és többmagvú óriás sejtek kialakulása, melyek a mitotikus katasztrófa meghatározó jellemzői közé tartoznak. A mikrotubulusokra gyakorolt hatása miatt a kelidonin potenciális mikrotubulus-célzó ágensnek tekinthető.

Mikrotubulus-célzó szerek

Napjainkra több tucat mikrotubulus-célzó ágenszt (MTA) izoláltak tengeri és szárazföldi élőlényekből. Ezek a másodlagos anyagcsere termékek képesek közvetlenül kötődni a tubulinhoz és megzavarni a mikrotubuláris rendszer szerkezetét és dinamikáját.

Az MTA-kat két osztályba sorolják: a mikrotubulus-stabilizátorok elősegítik a tubulin polimerizációját, míg a mikrotubulus-destabilizátorok a tubulin szálak depolimerizációját idézik elő. Az első osztályba tartozó kolhicinről kimutatták, hogy gátolja az IL-6 indukált STAT3 aktivációt szerin mutáns sejtekben. A második csoportba tartozó paklitaxelről pedig leírták, hogy befolyásolja a STAT3 szerin és tirozin foszforilációját.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkacsoportunk korábbi eredményei alapján a benzofenantridin-vázis alkaloidok családjába tartozó kelidonin apoptózist és nekrozist vált ki az OCM-1 humán, uveális melanóma eredetű sejteken. Irodalmi adatok alapján a kelidonin – a daganatterápiában széles körben alkalmazott mikrotubulus-célzó szerekhez hasonlóan – megzavarja a mikrotubulusok dinamikus instabilitását, a sejtciklust pedig a G₂/M fázisban berekeszti. Emellett több MTA esetén kimutatták, hogy beavatkozik a STAT3 transzkripció faktor tirozin és szerin foszforilációs folyamataiba.

Az előbbieket figyelembe véve kísérleteink során a következő kérdésekre kerestük a választ: (1) milyen hatással van a kelidonin az OCM-1 és OCM-3 uveális melanóma sejtek sejtciklusára; (2) változik-e kelidonin hatására az IL-6/gp130/STAT3 jelátviteli útvonal tagjainak, illetve a STAT3 által szabályozott antiapoptotikus Bcl-2 fehérjének az expressziója; (3) hogyan befolyásolja a kelidonin a STAT3 tirozin és szerin foszforilációját, illetve a kétfajta foszforilációra gyakorolt hatás között kimutatható-e korreláció.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleteinkhez OCM-1 és OCM-3 humán uveális primer melanóma sejtvonalakat használtunk. A humán melanómákban gyakori GNAQ és GNA11 mutáció egyik sejtvonalban sem, míg a BRAF (V600E) mutáció mindkettőben kimutatható. Az orsósejtes morfológiájú OCM-1 és az epithelioid sejtes morfológiájú OCM-3 sejtvonalakat egyaránt rosszindulatú humán uveális melanómákból hozták létre.

Az alkaloid kezelés során a sejteket 1 vagy 4 $\mu\text{g/ml}$ kelidonin jelenlétében tenyésztettük az adott kísérletnek megfelelő időtartamokig. A kontroll mintákhoz azonos mennyiségű DMSO-t mértünk, amiben a kelidonint is feloldottuk. Az alkaloid kezelést követően a felülúszót és a sejteket összegyűjtöttük, majd a mosást követően előkészítettük őket az immunfluoreszcenciás jelöléshez. A STAT3 transzkripció faktort IL-6-tal aktiváltuk.

Kísérleteinkben a sejtek életképességét, a fehérje expressziót, a STAT3 foszforilációját és magi transzlokációját fluoreszcens reagensekkel történő jelzést követően áramlási citometriával és/vagy konfokális mikroszkópiával vizsgáltuk. Az áramlási citometriás méréseket a FACS Array vagy a FACS Aria citométerekkel, míg a konfokális mikroszkópiás méréseket az Olympus Fluo View 1000 vagy Zeiss LSM 880 mikroszkópokkal végeztük el. Az áramlási citometriás adatokat az FCS Expressz programmal értékeltük ki, míg a konfokális mikroszkópiás képeket a FIJI és a Matlab szoftverekkel analizáltuk. Több sejtalkotó egyidejű jelöléséhez spektrálisan eltérő fluorofórral konjugált antitesteket használtunk. Az antitestek esetleges aspecifikus kötődését azonos izotípusú, irreleváns antitestekkel ellenőriztük. Az áramlási citométeres és/vagy konfokális mikroszkópiás vizsgálatokat minden esetben elvégeztük a jelöléstől számított 24 órán belül.

A STAT3 transzkripció faktor magi transzlokációját a FIJI képanalizáló programba beépített „Trainable Weka Segmentation” modul segítségével vizsgáltuk.

A statisztikai elemzésekhez Student-féle t-tesztet használtunk az Excel program segítségével. Azokat a változásokat tekintettük szignifikánsnak, ahol $p < 0,05$ volt.

EREDMÉNYEK

Kontroll vizsgálatok

Kísérletes munkánk egyik központi kérdése az volt, hogy a kelidonin miként befolyásolja a STAT3 tirozin foszforilációját, ezért különösen fontos volt, hogy maximalizáljuk az IL-6 stimulációra válaszoló sejtek hányadát, valamint az aktiváció mértékét. Az OCM-3 sejteken elvégzett optimalizációs kísérletek alapján a STAT3 aktiválására a 20 ng/ml-es IL-6 koncentrációt alkalmaztuk 30 percig.

Az alkaloid kezelés során a kelidonin feloldásához és hígításához DMSO-t használtunk, így kritikus kérdés volt annak megválaszolása, hogy a kísérleteinkben alkalmazott DMSO önmagában befolyásolja-e a STAT3 aktiváció mértékét. Ennek érdekében DMSO hiányában, valamint DMSO jelenlétében tenyésztett sejteken vizsgáltuk az IL-6 stimuláció hatásfokát. Eredményeink alapján kizárható, hogy az általunk alkalmazott koncentrációban a DMSO befolyásolná a STAT3 aktivációját, azaz kelidoninnal végzett kísérletek során tapasztalt változásokat kizárólag a kelidonin okozta.

A kelidonin apoptózist és nekrozist indukál humán melanóma sejteken

Kísérleteink során a kelidonin sejthalált kiváltó hatását DNS fragmentáción és az Annexin/PI-kötődésén alapuló áramlási citometriás mérésekkel vizsgáltuk meg. Mindkét módszerrel megerősítettük, hogy a kelidonin koncentráció-függő módon sejthalált idéz elő humán melanóma sejtvonalakon. Az Annexin/PI-kötődésén alapuló vizsgálatokkal bizonyítottuk, hogy a kelidonin az apoptózis mellett a sejtek kis hányadában késői apoptózist vagy nekrozist is indukál.

A kelidonin berekeszti a sejtciklust a G₂/M fázisban és károsítja a mikrotubuláris rendszert

A sejtciklust célzó kísérletek során ugyanazt a protokollt követtük, mint a DNS fragmentáció vizsgálatokkor. Eredményeink alapján leírható, hogy a kelidonin már szub-letális dózisban a legrövidebb kezelés esetében is mindkét sejtvonalon jelentős G₂/M blokkot eredményezett, ami a hosszabb kezelési időtartamokkal tovább emelkedett. Az alkaloid az OCM-3 sejtekre lassabban és mérsékeltebben fejtette ki hatását.

A sejtciklust befolyásoló ágensnek tekinthető kelidonin egyik legfontosabb intracelluláris célpontja a mikrotubuláris rendszer. A konfokális mikroszkópiás felvételeken megállapítottuk, hogy a kelidonin kezelés hatására a mikrotubuláris hálózat súlyos károsodást

szenvedett el, ideértve a kóros mitotikus orsófonalak képződését és a több orsó pólus kialakulását a mitózis során. Továbbá a mitotikus katasztrófára jellemző többmagvú, óriás sejtek megjelenését is megfigyeltük a képeken.

A kelidonin gátolja az IL-6-indukált STAT3 aktivációt

Következő lépésként megvizsgáltuk miként befolyásolja a kelidonin a STAT3 tirozin foszforilációját IL-6-tal stimulált és stimulálatlan OCM-1, valamint OCM-3 sejtvonalakon. Az IL-6 stimulált sejtek döntő többségében kimutattuk a fokozott tirozin foszforilációt, azaz a STAT3 aktivációját. A 24 órás kelidonin kezelés hatására a sejtek szignifikáns hányada nem volt képes reagálni az IL-6 stimulációra. Az alkaloid hatása „mindent vagy semmit” elvet követett, ugyanis az IL-6 stimulált sejtekben vagy teljes mértékben megszűnt a STAT3 aktiváció, vagy változatlan maradt a kezelést követően. A csökkent STAT3 aktivációt nem magyarázza a kelidonin indukált sejtpusztulás, ugyanis a halott sejtek frakciója szignifikánsan alacsonyabbnak adódott az IL 6 iránt csökkent válaszkészséget mutató sejtek részarányához képest.

Az IL-6 stimulálatlan sejtekben mérhető bazális (konstitutív) STAT3 tirozin foszforilációt a kelidonin nem befolyásolta. Ezzel ellentétben a kelidonin szignifikánsan megemelte a bazális szerin foszforilációt mindkét sejtvonal esetében. Az IL-6 stimulációnak elhanyagolható hatása volt a szerin foszforilációra függetlenül az előzetes kelidonin kezeléstől.

Kelidonin hatására csökken a gp130 alegység expressziója

Annak érdekében, hogy feltárjuk mi állhat a kelidonin-indukált csökkent STAT3 aktiváció hátterében, megvizsgáltuk a kelidonin hatását az IL-6/gp130/STAT3 jelátviteli útvonal bizonyos tagjainak az expressziójára. A 24 órás kelidonin kezelést követően a sejtek elhanyagolható hányadában tapasztaltuk a totál STAT3, az IL-6 α alegység és a Jak2 expressziójának a csökkenését. Ezért kizárható, hogy ezeknek a fehérjék megváltozott expressziója lenne felelős a csökkent STAT3 aktivációért.

A gp130 alegységet célzó méréseink során megállapítottuk, hogy a gp130 expressziója, bár különböző mértékben, de mindkét sejtvonal esetén szignifikánsan lecsökkent a kelidonin kezelés hatására. Azonban a gp130 kifejeződése csak részlegesen csökkent, ezért feltételezhető, hogy a gátolt tirozin foszforiláció hátterében egyéb tényezők is állnak.

Kelidonin hatására megemelkedik a konstitutív pSer-STAT3 szint

Következő kísérleteinkben a STAT3 másik foszforilációs helyére, a szerin 727 oldalláncra összpontosítottunk. Eredményeink alapján mindkét sejtvonalon már IL-6 stimuláció hiányában is kimutatható a STAT3 bazális szerin foszforilációja. IL-6 hatására a szerin foszforiláció mértéke nem, vagy csak kismértékben növekedett. A konstitutív pTyr-STAT3 szinttel ellentétben, amelyet az alkaloid nem befolyásolt, a STAT3 konstitutív szerin foszforilációjának szintje mindkét sejtvonalon szignifikánsan megemelkedett a kelidoninnal történő kezelés hatására. Hasonlóan a kontroll sejtekhez, az IL-6 stimuláció nem, vagy csak elhanyagolható mértékben változtatta meg a szerin foszforiláció mértékét a kelidoninnal kezelt sejteken

A csökkent STAT3 aktiváció és a megemelkedett pSer-STAT3 szint korrelált vizsgálata

A kelidonin a STAT3 szerin és tirozin foszforilációjára ellentétes hatást fejtett ki. Mindkét hatás csak a sejtek bizonyos hányadát érintette, ezért felmerült a kérdés van-e átfedés az alkaloid kezelésre a STAT3 tirozin, illetve szerin foszforilációja mértékének módosításával válaszoló sejtpopulációk között.

Áramlási citometriás adataink alapján a 24 órás kelidonin kezelést követően a megnövekedett bazális pSer-STAT3 szinttel rendelkező sejtek döntő többsége nem választott az IL-6 stimulációra, azaz az érintett sejtpopulációk között átfedés tapasztalható. Azonban ez az átfedés csak részleges volt, ugyanis az IL-6-ra adott válaszreakció elmaradását olyan sejtekben is kimutattuk, ahol nem tapasztalható a konstitutív pSer-STAT3 szint megemelkedése kelidonin hatására, valamint a megemelkedett pSer-STAT3 szinttel jellemezhető sejtek egy kisebb hányadában az IL-6 továbbra is képes volt STAT3 aktivációt kiváltani.

Konfokális mikroszkópiával szintén megerősítettük ezeket az eredményeket, valamint WEKA pixel alapú szegmentálási eljárással bizonyítottuk, hogy nemcsak a pTyr-STAT3 szintje, de magi transzlokációjának mértéke is csökken az emelkedett pSer-STAT3 szinttel jellemezhető sejtek jelentős hányadában.

A kelidonin időfüggő módon befolyásolja a STAT3 foszforilációt OCM-1 sejteken

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a kelidonin által kiváltott változások a STAT3 mindkét foszforiláció típusára idővel miként változnak. Ennek érdekében a szokásos 24 órás alkaloid kezelés mellett két rövidebb időpontot (6 és 12 óra) is alkalmaztunk, majd a STAT3

két foszforilációs helyét egyidejűleg spektrálisan eltérő monoklonális antitesttel megjelöltük. Az idő-függéses mérések során azt tapasztaltuk, hogy az általunk alkalmazott legrövidebb kelidonin kezelés is megemelte a konstitutív szerin foszforilációt és lecsökkentette az IL-6 válaszkészséget a sejtek alacsony, de szignifikáns hányadában. A citokin stimulációra nem reagáló sejtek frakciója monotonon növekedett az alkaloid kezelés időtartamával. Ezzel szemben az emelkedett pSer-STAT3 szinttel rendelkező sejtek hányada a két rövidebb kezelés során folyamatosan emelkedett, ugyanakkor a 24 óra elteltével valamelyest visszaesett, de még mindig szignifikánsan magasabb volt a kontroll mintákhoz képest.

Kelidonin hatására fokozódik a Bcl-2 expressziója

Mivel a kelidonin jelentős mértékben beavatkozik az IL-6/gp130/STAT3 jelátviteli útvonal működésébe, ezért megvizsgáltuk, hogy a csökkent STAT3 aktiváció minként befolyásolja a STAT3 egyik legfontosabb célgénjének a Bcl-2-nek az expresszióját. Megállapítottuk, hogy a kelidonin bár különböző mértékben, de mindkét sejtvonal esetén megemelte a Bcl-2 kifejeződését a sejtek szignifikáns hányadában. Továbbá azt is megfigyeltük, hogy a kelidonin kezelés hatására a Bcl-2 expresszió főként azokban a sejtekben emelkedett meg, melyekben elmaradt az IL-6 válaszreakció.

MEGBESZÉLÉS

PhD munkám során a kelidonin hatását tanulmányoztam az IL-6/gp130/STAT3 jelátviteli útvonalra. Irodalmi adatokkal összhangban kimutattuk, hogy a kelidonin sejthalált vált ki és berekeszti a sejtciklust a G2/M fázisban humán uveális melanóma sejtvonalakon. Mikroszkópos vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a kelidonin már alacsony koncentrációban is károsítja a mikrotubuláris rendszert, valamint kóros magorsó fonalak és többmagvú óriás sejtek kialakulását eredményezi. Ezek a patológiás elváltozások a mitotikus katasztrófa kialakulását sugallják, ami végső soron apoptózis-szerű sejthalálhoz vezet.

Az általunk használt konfokális mikroszkópiával kombinált áramlási citometriás megközelítések biztosították két paraméter sejtenkénti összehasonlítását és az egyes érintett populációk közötti átfedések feltárását. Így kimutattuk, hogy a kelidoni ellentétes hatást fejt ki a STAT3 kétfajta foszforilációjára: gátolja a IL-6 által kiváltott STAT3 aktivációt, de növeli a STAT3 szerin foszforilációs szintet. Ezen hatásokra a „mindent vagy semmi” elv érvényesül, azaz a STAT3 foszforilációs állapotát vagy jelentős mértékben megváltoztatta, vagy egyáltalán nem befolyásolta.

A kelidonin kétfajta STAT3 foszforilációra kifejtett hatása eltérő időkinetikát követett az általunk vizsgált időtartamokban. Az IL-6 stimulációra nem válaszoló (pTyr-STAT3^{ALA}) sejtek hányada monoton növekedett a kezelési idő függvényében. Ezzel szemben a fokozott konstitutív pSer-STAT3 (pSer-STAT3^{MAG}) szinttel jellemezhető sejtek aránya maximumgörbe szerint változott: a kezdeti emelkedést követően újból csökkenni kezdett, de a 24 órás kezelést követően is szignifikánsan meghaladta a kontroll esetén tapasztalt értéket. Eredményeink arra utalnak, hogy míg a szerin foszforilációra gyakorolt hatás átmeneti, addig a tirozin foszforiláció gátlása állandó, legalábbis a vizsgálataink időablakában. A kelidonin a STAT3 aktivációjára gyakorolt hosszútávú hatása hátterében nem a sejtek csökkent éltkéessége áll, ugyanis az IL-6 stimulációra nem válaszoló sejtek százalékos aránya a magasabb alkaloid koncentráció (4 µg/ml) esetén is jelentős mértékben meghaladta az elpusztult sejtek arányát.

A 24 órás kelidonin kezelés a pSer-STAT3^{MAG} sejtek jelentős hányadában gátolta a transzkripció faktor IL-6 által kiváltott aktivációját és magi transzlokációját, ami felveti a kétfajta foszforilációra gyakorolt hatás korrelációját. Azonban fontos megjegyezni, hogy a legrövidebb (6 órás) alkaloid kezelést követően a pSer-STAT3^{MAG} sejtek többségében az IL-6 stimuláció még képes volt STAT3 aktivációt kiváltani, valamint az IL-6-ra adott válaszreakció hiányát olyan sejtekben is kimutattuk, melyekben a pSer-STAT3 szint –

legalábbis látszólag – nem változott kelidonin hatására. Eredményeink alapján a kelidonin szerin foszforilációs mechanizmusokba történő beavatkozása időben megelőzi a tirozin foszforiláció gátlásához vezető hatását, továbbá a megemelkedett pSer-STAT3 szint önmagában nem elégséges, de nem is szükséges feltétele a STAT3 aktiválódás elmaradásának. Így valószínűleg nincs közvetlen ok-okozati összefüggés a kelidonin hatására megnövekedett pSer-STAT3 szint és a STAT3 aktiváció gátlása között, de ennek bizonyítására további vizsgálatok szükségesek.

Eredményeinket az irodalmi adatokkal összevetve úgy tűnik, hogy a STAT3 szerin foszforilációjában legalább két, különböző kinázok és regulátor fehérjék részvételét igénylő mechanizmus vesz részt. A STAT3 kanonikus funkcióinak ellátásához szükséges egy bizonyos konstitutív pSer-STAT3 szint, amely biztosítja a STAT3 maximális transzkripciós aktivitását és szabályozza a STAT3 aktiváció időtartamát. Saját vizsgálatainkban a STAT3 konstitutív szerin foszforilációja sem a STAT3 aktiválhatóságát, sem magi transzlokációját nem akadályozta.

A második mechanizmus felelhet a megemelkedett pSer-STAT3 szintért, amelynek a normál sejtciklus részeként mitózis kezdeti szakaszában van szerepe, de különböző stresszhatások, pl. UV-besugárzás, MTA kezelés stb. is kiválthatják vagy felerősíthetik. A kelidonin feltehetően a második mechanizmusért felelős folyamatokba avatkozott be, a STAT3 konstitutív szerin foszforilációját nem befolyásolta. Feltehetően bekapcsolta és/vagy felgyorsította a STAT3 szerin foszforilációt végrehajtó, azt pozitívan szabályozó folyamatokat (pl. Cdk1 aktiválódása), ugyanakkor a negatív szabályozó lépéseket nem befolyásolta. Ez utóbbit támasztja alá a hatás átmeneti jellege

Az időfüggő sejtciklus vizsgálataink eredményei alapján a G₂/M fázisban csapdázódott sejtek aránya jelentősen meghaladta a pSer-STAT3^{MAG} sejtek hányadát a kelidonin kezelés során, függetlenül a kezelés időtartamától. Ezen adatok megerősítik, hogy a STAT3 fokozott szerin foszforilációja a mitózis kezdeti szakaszához szükséges, és nem feltétele a kelidonin, vagy a kelidoninhoz hasonló MTA-k által kiváltott G₂/M blokk kialakításának.

A kelidonin hatására megváltozott STAT3 szerin és tirozin foszforiláció hátterében feltehetően nem a STAT3 jelátviteli tagjainak a kifejeződésére gyakorolt hatása áll, ugyanis a legtöbb tagnak nem változtatta meg az expresszióját. Bár a gp130 alegység kifejeződést részben csökkenti a kelidonin, de nem szünteti meg teljesen, ami azt sugallja, hogy a sejtek továbbra is funkcionálisan működő IL-6 receptor komplexeket hordozhatnak.

A Bcl-2 antiapoptotikus fehérje expresszióját célzó kísérleteinkkel megállapítottuk, hogy a kelidonin kezelés hatására a mindkét sejtvonalon megjelent egy fokozott Bcl-2

expresszióval jellemezhető alpopuláció. A Bcl-2 expresszió és a pTyr-STAT3 szint korrelált vizsgálatára vonatkozó kísérleteink feltárták, hogy a fokozott Bcl-2 expresszióval jellemezhető sejtpopuláció jelentős hányadában gátolt STAT3 IL-6 által kiváltott aktivációja, a pSer-STAT3 szint esetén tapasztaltakhoz hasonlóan. További vizsgálatokra van szükség annak feltárására, hogy a Bcl-2 és pSer-STAT3 szintek megemelkedése között van-e kapcsolat

A sejtciklus szabályozásában és a tumorigenezisben betöltött vitathatatlan szerepük miatt a STAT3 szerin és tirozin foszforilációjának a szabályozása és a köztük lévő kapcsolatnak a vizsgálata kiemelkedő fontosságú lehet a daganat ellenes terápiák szempontjából. Jelen tanulmány az elsőként mutatta be egyedi sejtekre vonatkozóan, hogy a mikrotubulusokat célzó szerek közé sorolható kelidonin reciprok módon befolyásolja a STAT3 kétféle foszforilációját, mely segíthet ezen szerek hatásmechanizmusának és a szerin foszforiláció szerepének a részletesebb feltérképezését a STAT3 funkcióban. Eredményeink, az MTA szerekkel kapcsolatos irodalmi adatokkal együtt, felvetik a kelidonin potenciális alkalmazhatóságát uveális melanómák, illetve feltehetően egyéb, szolid daganatok kombinációs/multimodális terápiájában.

ÖSSZEFOGLALÁS

Itt bemutatott munkám során a kelidonin hatását tanulmányoztam az IL-6/IL-6R/STAT3 jelátviteli útvonalra humán uveális melanóma sejtvonalakon. Irodalmi adatokkal összhangban kimutattuk, hogy a kelidonin sejthalált vált ki és berekeszti a sejtciklust a G₂/M fázisban. Mikroszkópos vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a kelidonin már alacsony koncentrációban is károsítja a mikrotubuláris rendszert, valamint kóros magorsó fonalak és többmagvú óriás sejtek kialakulását eredményezi. Ezek a patológiás elváltozások a mitotikus katasztrófa kialakulását sugallják, ami végső soron apoptózis-szerű sejthalálhoz vezet.

Kimutattuk, hogy a kelidonin gátolja az IL-6 által kiváltott STAT3 aktivációt (tirozin foszforilációt), ugyanakkor növeli a STAT3 szerin foszforilációjának hatékonyságát. Szemben az irodalomban fellelhető, biokémiai módszerekkel nyert adatokkal, az általunk alkalmazott áramlási citometriás és konfokális mikroszkópiás megközelítések lehetővé tették a STAT3 kétféle foszforilációjának sejtenkénti összehasonlítását, valamint a kelidonin kezelésre eltérően reagáló sejtpopulációk azonosítását. Ily módon feltártuk, hogy mindkét hatásban a „mindent vagy semmi” elv érvényesül, azaz a STAT3 foszforilációs állapotát a kelidonin vagy jelentős mértékben megváltoztatta vagy egyáltalán nem befolyásolta.

A kétfajta STAT3 foszforilációra kifejtett hatás eltérő időkinetikát követett. Míg az IL-6 stimulációra nem válaszoló sejtek hányada monoton növekedett a kezelési idő függvényében, a fokozott pSer-STAT3 szinttel jellemezhető sejtek aránya maximummal rendelkező görbe szerint változott. Mindez arra utal, hogy míg a kelidonin szerin foszforilációra kifejtett hatása átmeneti, a STAT3 aktiváció gátlása hosszútávon fennmarad. A kétféle hatás által érintett sejtpopulációk között tapasztaltunk átfedést, ugyanakkor közvetlen ok-okozati összefüggést nem tudtunk kimutatni.

Az IL-6/IL-6R/STAT3 jelátviteli útvonal legtöbb elemének expressziója a sejtek döntő többségében nem változott szignifikánsan kelidonin hatására. Bár a gp130 expresszió a sejtek egy jelentős hányadában csökkent, a funkcionális IL-6R komplexek ezeken a sejteken is kialakulhatnak. Így a jelátviteli útvonal tagjainak megváltozott expressziója kizárható a STAT3 aktiváció közvetlen okaként.

Kelidonin hatására megjelent egy fokozott Bcl-2 expresszióval jellemezhető alpopuláció, amely hasonló mértékű átfedést mutatott az IL-6-ra nem válaszoló sejtpopulációval, mint amit a fokozott pSer-STAT3 szinttel jellemzhető sejtek esetén tapasztaltunk.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Dóczy-Bodnár Andreának, hogy csatlakozhattam már tudományos diákkörös, később doktorandusz hallgatóként kutatómunkájához. Köszönöm szakmai iránymutatását, hasznos tanácsait, támogatását, valamint tudományos közleményeim és a doktori disszertációm elkészítésében való részvételét és segítségét. Köszönöm Prof. Dr. Mátyus Lászlónak, hogy a Membrándinamikai kutatócsoport vezetőjeként biztosította számomra a kísérletes munkák anyagi és tárgyi feltételeit.

Köszönöm a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet jelenlegi és korábbi igazgatóinak, Prof. Dr. Panyi Györgynek, Prof. Dr. Szöllősi Jánosnak és Prof. Dr. Damjanovich Sándornak, hogy intézetükben számos modern biofizikai és molekuláris biológiai módszert megismerhettem és elsajátíthattam.

Köszönet jár a munkacsoportunk asszisztenseinek, Utasi-Szabó Rita Katalinnak, Nagy Edinának és Bagosi Adriennek, a sejtek kezelésében és a kísérletes munka összeállításában nyújtott szakmai segítségükért.

Köszönetet mondok a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet valamennyi munkatársának, különösen Prof. Dr. Nagy Péternek, Dr. Vámosi Györgynek, Dr. Nizsalóczki Enikőnek, Dr. Mocsár Gábornak és Dr. Volkó Juliannának a hasznos szakmai tanácsaikért.

Végezetül köszönöm barátaimnak és családomnak, valamint drága feleségemnek töretlen támogatásukat és szeretetüket.

A disszertáció elkészítését az EU és az Európai Szociális Alap által társfinanszírozott EFOP-3.6.3-VEKOP-16-7-00009 projekt, valamint a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal ANN 135107, ANN 133421 és K138075 pályázatai támogatták.



Nyilvántartási szám: DEENK/435/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Csomós István
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10053378

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Csomós, I.**, Nagy, P., Filep, C. B., Rebenku, I., Nizsalóczki, E., Kovács, T., Vámosi, G., Mátyus, L., Dóczy-Bodnár, A.: Opposing Effects of Chelidonine on Tyrosine and Serine Phosphorylation of STAT3 in Human Uveal Melanoma Cells.
Int. J. Mol. Sci. 22 (23), 1-14, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms222312974>
IF: 6.208
2. Nizsalóczki, E., **Csomós, I.**, Nagy, P., Fazekas, Z., Goldman, C. K., Waldmann, T. A., Damjanovich, S., Vámosi, G., Mátyus, L., Dóczy-Bodnár, A.: Distinct spatial relationship of the interleukin-9 receptor with interleukin-2 receptor and major histocompatibility complex glycoproteins in human T lymphoma cells.
ChemPhysChem. 15 (18), 3969-3978, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cphc.201402501>
IF: 3.419

További közlemények

3. Vámos, A., Shaw, A., Varga, K., **Csomós, I.**, Mocsár, G., Balajthy, Z., Lányi, C., Bacsó, Z., Szatmári-Tóth, M., Kristóf, E.: Mitophagy Mediates the Beige to White Transition of Human Primary Subcutaneous Adipocytes Ex Vivo.
Pharmaceuticals (Basel). 15 (3), 1-21, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph15030363>
IF: 5.215 (2021)
4. Shaw, A., Bartáné Tóth, B., Arianti, R., **Csomós, I.**, Pólska, S., Vámos, A., Bacsó, Z., Győry, F., Fésüs, L., Kristóf, E.: BMP7 increases UCP1-dependent and independent thermogenesis with a unique gene expression program in human neck area derived adipocytes.
Pharmaceuticals (Basel). 14 (11), 1-21, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph14111078>
IF: 5.215





5. Shaw, A., Bartáné Tóth, B., Király, R., Arianti, R., **Csomós, I.**, Póliska, S., Vámos, A., Korponay-Szabó, I., Bacsó, Z., Győry, F., Fésüs, L., Kristóf, E.: Irisin stimulates the release of CXCL1 from differentiating human subcutaneous and deep-neck derived adipocytes via upregulation of NF[κ]B pathway.
Front. Cell. Dev. Biol. 9, 1-19, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2021.737872>
IF: 6.081
6. Szatmári-Tóth, M., Shaw, A., **Csomós, I.**, Mocsár, G., Fischer-Posovszky, P., Wabitsch, M., Balajthy, Z., Lányi, C., Győry, F., Kristóf, E., Fésüs, L.: Thermogenic Activation Downregulates High Mitophagy Rate in Human Masked and Mature Beige Adipocytes.
Int. J. Mol. Sci. 21 (18), 1-21, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21186640>
IF: 5.924
7. Nizsalóczi, E., Nagy, P., Mocsár, G., Nagyné Szabó, Á. T., **Csomós, I.**, Waldmann, T. A., Vámosi, G., Mátyus, L., Dóczy-Bodnár, A.: Minimum degree of overlap between IL-9R and IL-2R on human T lymphoma cells: a quantitative CLSM and FRET analysis.
Cytom. Part A 93 (11), 1106-1117, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.23634>
IF: 3.433
8. Ergülen, E., Bécsi, B., **Csomós, I.**, Fésüs, L., Kanchan, K.: Identification of DNAJA1 as a novel interacting partner and substrate of human transglutaminase 2.
Biochem. J. 473 (21), 3889-3901, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1042/BCJ20160440>
IF: 3.797
9. Csomós, K., Kristóf, E., Márkus, B., **Csomós, I.**, Kovács, G., Rotem, O., Hodrea, J., Bagoly, Z., Muszbek, L., Balajthy, Z., Csősz, É., Fésüs, L.: Protein cross-linking by chlorinated polyamines and transglutamylation stabilizes neutrophil extracellular traps.
Cell Death Dis. 7 (8), e2332, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2016.200>
IF: 5.965
10. Kovács, T., Batta, G., Hajdu, T., Nagyné Szabó, Á. T., Váradi, T., Zákány, F., **Csomós, I.**, Szöllősi, J., Nagy, P.: The Dipole Potential Modifies the Clustering and Ligand Binding Affinity of ErbB Proteins and Their Signaling Efficiency.
Sci. Rep. 6, 35850, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/srep35850>
IF: 4.259





11. Sárvári, A. K., Doan-Xuan, Q. M., Bacsó, Z., **Csomós, I.**, Balajthy, Z., Fésüs, L.: Interaction of differentiated human adipocytes with macrophages leads to trogocytosis and selective IL-6 secretion.
Cell Death Dis. 6, e1613, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2014.579>
IF: 5.378

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 54,894

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
9,627**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2022.10.06.

